# Agilent Poroshell HPH C18 を用いた三環系抗うつ剤の研究

アプリケーションノート

低分子医薬品


## 著者

William Long

Agilent Technologies, Inc.


## はじめに

三環系抗うつ剤 (TCA) は 1950 年代初期に最初に発見され、同 50 年代後期に上市されました。その化学構造には、原子の環状構造が 3 つあります。四環系抗うつ剤は、原子の環状構造が 4 つありますが、抗うつ性化合物として関連の深いグループの 1 つです。

環系抗うつ剤は最初に開発された抗うつ剤の一部です。あまり副作用がない新規薬剤により置き換えられることもしばしばありましたが、未だに多くの人々にとって優れた選択肢のうちの 1 つです。環系抗うつ剤は脳に有効なセロトニンやノルエピネフリンなどといった神経伝達物質を多く産生させることで機能します。この機能により、脳細胞間の良好なコミュニケーションが支援され、気分に影響がでてきます。ドキセピンやアミトリプチリンなどの 3 級 アミン TCA は、ノルトリプチリンやデシプラミンなどの 2 級 アミン TCA よりも強力な、セロトニン再取り込み阻害剤です [1、2、3]。

Agilent Technologies

さらに、三環系アミンはクロマトグラフィーのプローブとしても重要です。図 1 は、これらの化合物が高 pKa 値、9.2 ～ 9.6 を持つことを示します。pH 7.0 では、シリカシラノールが それらのイオン化された状態にあり、TCA などの塩基性プローブは高度にプロトン化されています。中性の pH では、TCA はシリカシラノールに曝露されると、イオン交換相互作用を起こします。シラノールをさらに多く曝露すると、より多くのピークテーリングを見ることができます。アミトリプチリンのテーリングファクターは、シラノールの活動性の尺度としても用いることができます [4]。

この実験では、三環系抗うつ剤の分析を行って、Agilent Poroshell HPH C18 カラムと他社製のカラムとの性能を比較しました。

## 実験

Agilent 1260 Infinity LC を使用しました。構成は以下のとおりです。

- Agilent 1260 Infinity バイナリポンプ SL、最大 600 bar での送液に対応 (G1312B)
- Agilent 1260 Infinity カラムコンパートメント (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity 高性能オートサンプラ SL Plus (G1376C)
- Agilent 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G4212A)、10 mm 光路長、1 µL フローセル付き (p/n G4212-60008)

この実験では以下のカラムを使用しました。

- Agilent Poroshell HPH C18、3 × 100 mm、2.7 µm (p/n 695975-502)
- Agilent Poroshell HPH C18、3 × 100 mm、4 µm (p/n 695970-502)
- 高 pH で安定な他社製の新規表面多孔性カラム、3 × 100 mm、2.6 µm および 5 µm

機器のコントロールとデータ処理には、Agilent ChemStation ソフトウェアバージョン C.1.05 を使用しました。

検討した化合物はウラシル (50 µg/mL)、塩酸ドキセピン (250 µg/mL)、塩酸ノルトリプチリン (500 µg/mL)、塩酸アミトリプチリン (250 µg/mL)、およびマレイン酸トリミプラミン (500 µg/mL) でした。すべて Sigma-Aldrich 社から購入し、水で調製しました。図 1 に構造式および詳細を示します。さらに、リン酸ナトリウム二塩基二水和物およびリン酸ナトリウム一塩基二水和物を Sigma-Aldrich から購入し、別々に 20 mM に調製し、pH 7.0 としました。アセトニトリルは Honeywell (Burdick and Jackson) 製のものです。用いた水は Milli-Q システム (Millipore) の 0.2 µm ろ過 18 MW です。カラムの評価には、あらかじめ混合されたアセトニトリル 60 % および 20 mM リン酸ナトリウム 40 % からなる移動相を用いました。カラムは 25 ℃ に加熱し、実験前に 10 分間、1 mL/min で平衡化しました。

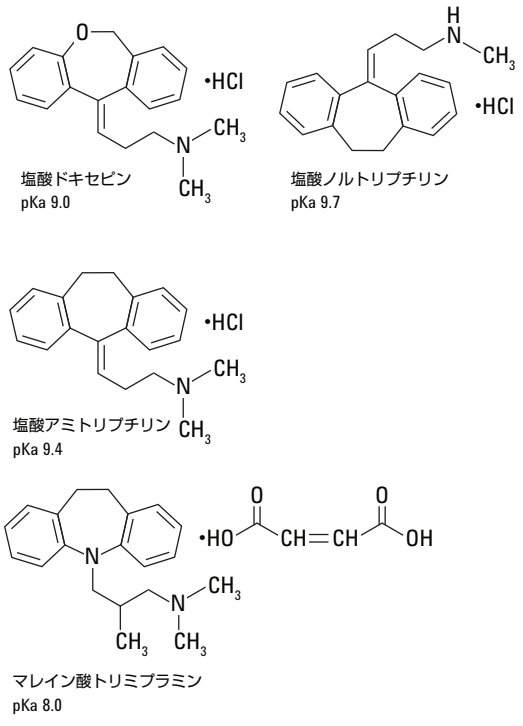



図 1. 三環系アミンの構造。

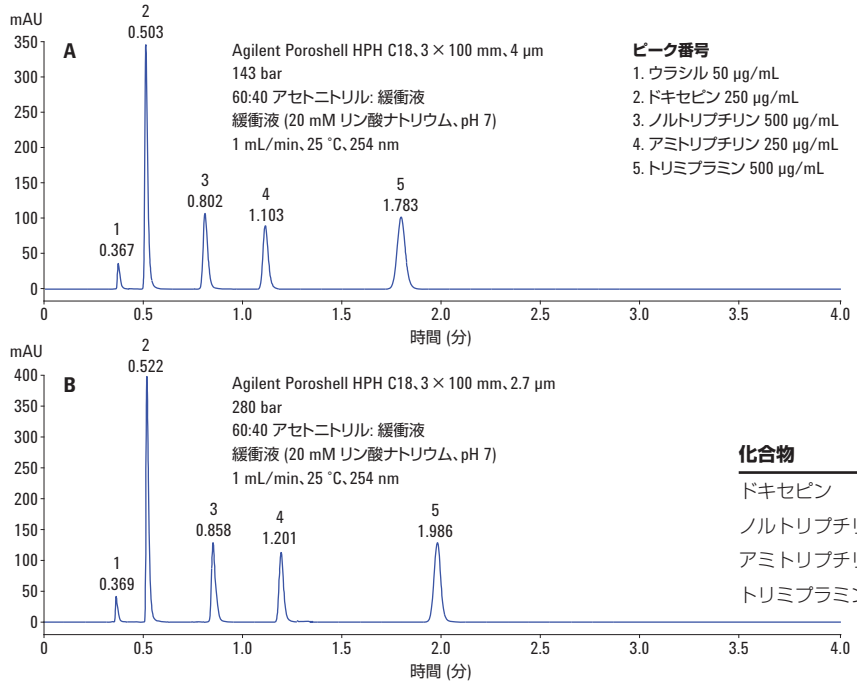
## 結果と考察

図 1 に示すとおり、TCA の pKa 値は 8 ～ 10 にあり、これらの化合物を明らかに塩基として分類されます。通常、塩基などのイオン化された化合物を含むサンプルは pH 3 以下の移動相で最も良く分離することができます。この pH ではカラムシラノール相互作用の可能性が最低限に抑えられます。pH 5.5 では、カラム表面の上記シラノールは O- として存在できます。こうした陰性に帯電した表面シラノールは、陽性に帯電した塩基化合物とイオン交換相互作用を起こすことができます。これが最も多くみられるタイプのピークテーリングです。しかし、サンプル成分が低 pH では安定しないため、最適な分離は中性 (4 ～ 8) と高 pH (> 9) で行われます。塩基性化合物は低 pH でプロトン化され、あまりにも早く溶出するか、低 pH ではみられないバンド間隔を必要とします。

研究者の多くは、カラムの障害を伴うシリカ充填材の溶解の可能性があるために、従来のシリカベースのカラムを高 pH (例: pH> 8) で用いることは通常推奨しません。pH 6 ～ 8 の範囲内での操作が設計された分離では問題が生じる可能性があります。この pH 範囲においてはシリカ充填材の溶解が有意になるため、分離の再現性やカラムの寿命が期待を満たしません。中性 (から高) pH でのシリカベースのカラムの劣化は、結合した有機基質の加水分解による損失よりも、大部分はシリカ充填材の溶解のためであることが報告されています [5]。また、特に高温で高濃度のリン酸緩衝液の存在下では、pH 6 ～ 8 の範囲でのシリカ充填材の溶解度が大幅に上昇することが分かっています [6]。

Agilent Poroshell HPH C18 カラムは、炭酸水素アンモニウムとリン酸緩衝液において安定であることが示され、中～高 pH でのアプリケーション用のカラムとしてよく選択されるようになりました。このカラムを用いて公表されたアプリケーションでは、リン酸/ホウ酸緩衝液、トリエタノールアミン/リン酸緩衝液、またリン酸、水酸化アンモニウム、および炭酸水素アンモニウム緩衝液が使用されています。こうしたカラムによって研究者は表面多孔性カラムの高効率性と高 pH あるいは高温での長寿命といった利点を得ることができます [7、8、9]。

図 2 では、3 × 100 mm のフォーマットで、Poroshell HPH C18、4 µm カラム (A) と 2.7 µm カラム (B) とのサンプルクロマトグラムを示します。これらの寸法は、従来の 4.6 mm フォーマットよりも溶剤の使用量が少ないため、よく用いられるようになりました。溶媒の使用量が抑えられることで、溶剤の購入および廃棄のための運用コストを抑えることができます。3 × 100 mm のカラムは頻繁に質量分析にも用いられます。要約表およびサンプルクロマトグラムに示されるとおり、ピーク形状はすべて良好でテーリングが軽微です。トリミプラミンのピーク効率効率は 2.7 µm カラムでは 15,679 であり、4 µm カラムでは 8,616 です。両方のカラムは 400 bar の装置で容易に操作可能で、2.7 µm カラムでは 280 bar の圧力および 4 µm カラムでは 143 bar でした。4 µm カラムでのリテンションタイムは 2.7 µm カラムよりも僅かに短いものの、化合物の溶出順序および選択性は双方で類似しており、これらのカラムのスケーラビリティを示しています。



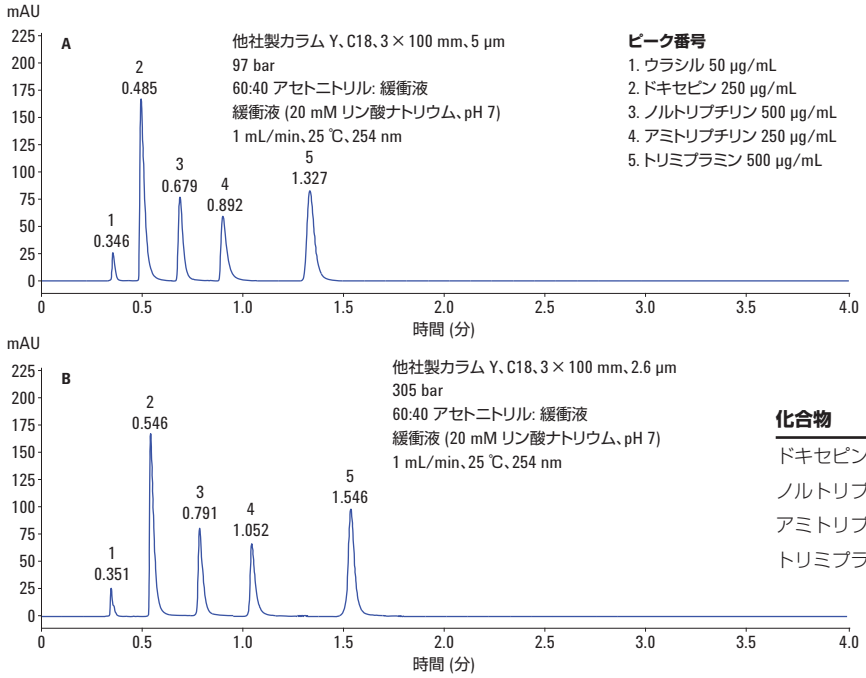

| 化合物 | テーリング Agilent Poroshell HPH C18、4 µm | 効率 Agilent Poroshell HPH C18、4 µm | テーリング Agilent Poroshell HPH C18、2.7 µm | 効率 Agilent Poroshell HPH C18、2.7 µm |
|---|---|---|---|---|
| ドキセピン | 1.68 | 6,125 | 1.96 | 8,162 |
| ノルトリプチリン | 1.36 | 5,701 | 1.52 | 9,557 |
| アミトリプチリン | 1.25 | 7,883 | 1.31 | 14,084 |
| トリミプラミン | 1.07 | 8,616 | 1.05 | 15,679 |

図 2. Agilent Poroshell HPH C18 カラムの pH 7 のリン酸緩衝液内の三環系抗うつ剤混合物。

図 3 には、高 pH で安定な他社製の表面多孔性カラム 2 種からのサンプルクロマトグラムを示します。このサンプルクロマトグラムは三環系アミンのピーク形状が、図 2 の Poroshell HPH C18 カラムによって得られたものより劣っていたことを示します。塩基によるこのピーク形状の悪化のために、他社製の 2.6 µm カラムでの効率は、Poroshell HPH C18、2.7 µm カラムより低下しています。他社製の 5 µm での圧力は、Poroshell HPH 4 µm カラムより低いものの、その差異はわずかです。

## 結論

Agilent Poroshell HPH C18 カラムは中～高 pH で炭酸水素アンモニウムとリン酸緩衝液内での高耐久性を保持しており、研究者にとっての優れた選択肢の 1 つであることが示されました。このアプリケーションノートでは、Poroshell HPH C18 の優れたピーク形状を他社製のものと比較しています。ピーク形状はカラム効率に影響を与えるため、特に塩基性の製剤化合物を分析する場合には、ピーク形状が優れていることが重要となります。




| 化合物 | テーリング 効率 他社製 Y、2.6 µm | 効率 他社製 Y、2.6 µm | テーリング 他社製 Y、5 µm | 効率 他社製 Y、5 µm |
|---|---|---|---|---|
| ドキセピン | 3.22 | 3,099 | 2.97 | 2,522 |
| ノルトリプチリン | 2.07 | 6,710 | 1.96 | 4,056 |
| アミトリプチリン | 2.14 | 9,163 | 2.41 | 4,684 |
| トリミプラミン | 1.29 | 13,657 | 1.6 | 5,968 |

図 3. 他社製の表面多孔性カラムでの pH 7 のリン酸緩衝液中の三環系抗うつ剤混合物。

## 参考文献


1. Tricyclic antidepressants and tetracyclic antidepressants. http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/depression/in-depth/antidepressants/art-20046983.
2. Tricyclic antidepressants. https://en.wikipedia.org/wiki/Tricyclic_antidepressant
3. Doxepin. http://www.drugbank.ca/drugs/DB01142
4. Jing, L. L.; Jiang, R.; Liu, P.; Wang, P.; Shi, T. Y.; Sun, X. Selectivity differences between alkyl and polar modified alkyl phases in reversed phase high performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 212-220.
5. Kirkland, J. J.; Henderson, J. W.; DeStefano, J. J.; van Straten, M. A.; Claessens, H. A. Stability of silica-based, endcapped columns with pH 7 and 11 mobile phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatog. A*. **1997**, *762*, 97-112.
6. Claessens, H.; van Straten, M. A.; Kirkland, J. J. Effect of buffers on silica-based column stability in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1996**, *728*, 259-270.
7. Long, W. J.; Mack, A. E.; Xiaoli, Wang; Barber, W. E. Selectivity and Sensitivity Improvements for Ionizable Analytes Using High-pH-Stable Superficially Porous Particles. *LCGC* **2015**, *33* (4).
8. W. J. Long. *Automated Amino Acid Analysis using an Agilent Poroshell HPH C18 column*; Application Note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-5571EN, **2015**.
9. R. Fu, Q. Lei. *Fast Analysis of Oxidative Hair Dyes at High pH with Poroshell HPH C18 and Other Phases*; Application Note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-5263EN, **2014**.


## 詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。
アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

www.agilent.com/chem

本資料掲載の製品は、すべて研究用です。診断目的では使用できません。

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
©Agilent Technologies, Inc. 2015
Printed in Japan
December 7, 2015
5991-6512JAJP



Agilent Technologies